

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ОБЛИГАТНО-ГЕПАТОТРОПНЫХ ВИРУСОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И ИСХОДЫ БОЛЕЗНИ

Проф. В. П. МАЛЫЙ¹, доц. Т. И. ЛЯДОВА², доц. О. В. ВОЛОБУЕВА²,
канд. мед. наук О. В. ГОЛОЛОБОВА¹

¹ Харьковская медицинская академия последипломного образования,

² Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина

Проведено генотипирование облигатно-гепатотропных вирусов, установлены доминирующие генотипы и геноварианты, описаны особенности клинических проявлений и исходы заболевания у больных с различными генотипами и манифестными формами вирусных гепатитов различной этиологии.

Ключевые слова: иммунодиагностика, генодиагностика, клиническое значение.

В структуре инфекционных заболеваний проблема вирусных гепатитов (ВГ) является одной из наиболее актуальных. Это обусловлено высоким уровнем заболеваемости, широким распространением среди населения, большим количеством незарегистрированных активных источников инфекции в виде больных с безжелтушными формами гепатитов и формированием хронических заболеваний печени с последующим переходом в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному.

Такая ситуация обусловлена, с одной стороны, факторами хозяина, в частности, особенностями реагирования иммунной системы, с другой — факторами вируса, которые позволяют ему противостоять механизмам иммунитета, выживать в макроорганизме, влиять на исходы заболевания и эффективность проводимой противовирусной терапии.

Современный этап клинических исследований характеризуется широким использованием новых молекулярно-генетических методов диагностики, таких как индикация специфических антител к вирусам посредством иммуноферментного анализа (ИФА), выявление нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшим определением генотипа и геноварианта вируса (рестрикционный анализ и метод прямого секвенирования). Эти методы верификации и идентификации возбудителей позволили значительно расширить существующие представления об этиологии облигатно-гепатотропных вирусов. Результаты генотипирования характеризуются большой однозначностью по сравнению с другими методами исследования и представляют непосредственную информацию для выявления эволюционных и эпидемиологических связей различных изолятов вирусов.

В настоящее время молекулярно-генетические методы типирования ВГ составляют основу молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов,

целью которой является изучение циркуляции отдельных генетических вариантов возбудителей и их причинной связи с возникновением и распространением инфекционных заболеваний.

Изоляты вируса гепатита А (ГА, HAV) подразделяют на 7 генотипов, которые обозначаются римскими цифрами от I до VII [1, 2]. Генотипы вируса I, II, III и VII вызывают заболевание у человека, а генотипы IV, V, VI — у обезьян. Отличия между изолятами HAV, выделенными в разных регионах мира по нуклеотидным последовательностям геномной РНК, составляют 15–25%, а на уровне генотипов и субтипов — 7,5%. При этом аминокислотные последовательности изолятов HAV достаточно консервативны, что объясняет наличие всего одного серотипа у этого вируса. По данным исследователей [3], наиболее тяжелое течение заболевания отмечается у лиц с генотипом IB, IIIA, тогда как средне-тяжелые формы наблюдаются при IA генотипе.

О гетерогенности популяции гепатита В (ГВ, HBV) стало известно еще в середине 70-х годов прошлого столетия, когда экспериментально серологическими методами было доказано существование субтипов поверхностного антигена вируса — HBsAg. При этом была найдена одна общая детерминанта а, которая в комбинации с 2 дополнительными детерминантами d/y и w/r образовывала 4 субтипа HBsAg: adw, ayw, adr, aug. Позже были описаны новые варианты детерминант, и общее количество субтипов достигло 9. На основании анализа нуклеотидных последовательностей S-гена изоляты HBV, выделенные в разных регионах мира, объединили в 8 основных генотипов, которые назвали заглавными буквами латинского алфавита: А, В, С, D, E, F, G и H. Следует отметить, что полное соответствие между генотипами HBV и серотипами HBsAg не установлено. Так, изоляты HBV, которые относятся к четырем абсолютно разным генотипам А, В, С и F, могут иметь один и тот же серотип adw2 [2, 4, 5].

Вирус гепатита С (ГС, HCV) среди других ВГ характеризуется наибольшей генетической вариабельностью генома. Согласно классификации все изоляты HCV группируются в 6 главных генотипов, которые обозначаются арабскими цифрами от 1 до 6. Внутри каждого генотипа выделяют субтипы, которые включают изоляты, состоящие из квазивидов. На принадлежность изолята к определенному субтипу указывают прописные латинские буквы, которые пишутся вслед за арабской цифрой: HCV1a, HCV1b, HCV1c, HCV2a и т. д. В настоящее время известно более 100 субтипов HCV [6, 7].

Изоляты HDV сгруппированы в 3 генотипа, которые обозначаются римскими цифрами — I, II, III [6, 7].

К настоящему времени предложено выделять 5 генотипов вируса гепатита G (ГГ), у которых установлена закономерность территориального распространения. Первый генотип встречается только в Западной Африке, второй преобладает в Северной Америке, Европе, Азии и Северной Африке, третий и четвертый генотип — в Юго-Восточной Азии, пятый — в Южной Америке. По данным исследователей, на территории Украины, России и стран СНГ доминирует второй генотип [8].

У верифицированного в 1997 г. ДНК-содержащего вируса TTV различают 16 генотипов — G1–G16, роль которых в патологии печени изучается [9].

Таким образом, популяции ВГ насчитывают сотни генетических вариантов. В связи с этим использование рутинных лабораторных методов диагностики ВГ, основанных на определении антигенов и антител, не может дать информацию об особенностях циркуляции разных вариантов ВГ среди населения, о наличии связи между изолятами ВГ, выделенными как от отдельных пациентов, так и групп пациентов, вовлеченных во вспышки, количество которых за последние годы значительно возросло.

К сожалению, изучение генотипов облигатно-гепатотропных вирусов, циркулирующих на территории Украины, и влияние их на течение и исходы заболевания является крайне слабым звеном в работе лабораторной службы Украины.

Цель данной работы — на основании генодиагностических исследований изучить клиническое течение, тяжесть и последствия ВГ с разнообразными механизмами передачи инфекции.

Были обследованы 163 больных острым ГВ (ОГВ) и 155 больных HCV-инфекцией: 37 больных острым ГС (ОГС) и 117 — хроническим ГС (ХГС) в Харьковском регионе, 76 больных ОГВ и 54 больных хроническим ГВ (ХГВ) в Закарпатском регионе.

Диагноз устанавливался с учетом комплекса клинико-эпидемиологических, лабораторно-инструментальных данных обследования и подтверждался выявлением в сыворотке крови специфических

серологических маркеров ВГ (анти-HAV IgM, HBsAg, анти-HBcIgM, анти-HBcIgG, HBeAg, анти-HBe, анти-HCV (сум.), анти-HCV IgM и IgG, анти-HCV core и анти-HCV NS-3, NS-4, NS-5, анти-HDV IgM) методом ИФА (ELISA) посредством тест-систем НПО «Диагностические системы» (Россия) и ПЦР (РНК HAV, ДНК HBV и РНК HDV, РНК HCV, РНК HGV и ДНК TTV). Клинико-патогенетические варианты течения, форму и степень тяжести ВГ определяли согласно общепринятым в клинической практике критериям (МКБ-10).

Материалом для проведения исследований была сыворотка крови больных в разные периоды заболевания (разгара, реконвалесценции).

Молекулярно-биологические исследования включали определение репликативной активности ВГ на основании выявления в сыворотке крови РНК и ДНК исследуемых вирусов методом ПЦР с использованием тест-систем ЦНИИ эпидемиологии МЗ РФ. Генотипирование вирусов проводилось с путем рестрикционного анализа по методу М. Mizokami и соавт. (1999) в модификации ЦНИИЭ г. Москвы.

Полученные результаты статистически обработаны с использованием методов вариационной статистики, которая осуществлялась посредством программ Exsel-2002 и Statistica for Windows (Statsoft Inc, США) на компьютере с процессором CPU Athlon 64-3200 Tray.

При генотипировании вируса ГВ у 208 (84,5%) больных был установлен генотип D вируса ГВ, у 17 (8,4%) пациентов — генотип А. У 14 (7,1%) больных была выявлена ДНК HBV, но генотип вируса установить не удалось (рис. 1а).

При обследовании больных ХГВ была зарегистрирована почти одинаковая частота как генотипа А, так и генотипа D HBV — 41,8 и 39,2% соответственно (рис. 1б). Некоторые специалисты считают, что генотип А вируса ГВ имеет более низкую антигенность по сравнению с генотипом D и, вследствие этого, более низкую способность, чем генотип D, индуцировать иммунный ответ, поэтому данный генотип ассоциируется с большим риском развития хронического гепатита.

По результатам генодиагностических исследований с определением генотипов вируса ГВ у пациентов с ОГВ установлено значительное преобладание как в Харьковском, так и Закарпатском регионах генотипа D (90,8 и 71,1%) и редкая встречаемость генотипа А (2,5 и 19,7%) соответственно.

Следует отметить, что частота выявления генотипа А HBV в Закарпатском регионе значительно превышала таковую среди пациентов с острой HBV-инфекцией в Харьковском регионе — 19,7% и 2,5% соответственно, что является свидетельством особенности территориального распространения генотипов HBV в Украине.

Для выявления возможной взаимосвязи между клиническими проявлениями болезни и генотипом HBV нами проводилось сравнение частоты

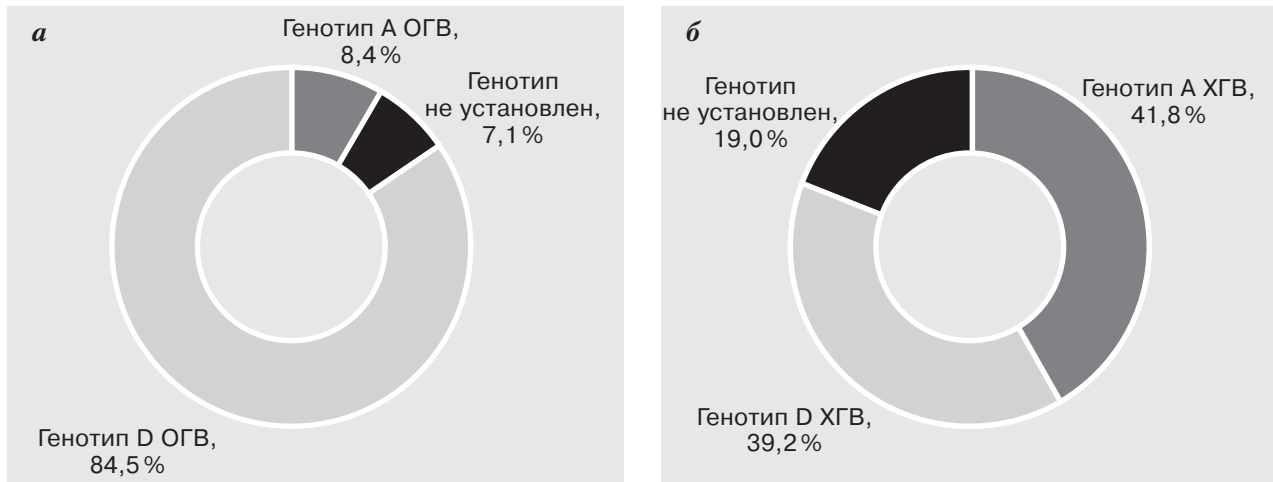


Рис. 1. Частота выявления отдельных генотипов HBV у 239 пациентов с ОГВ (а) и 54 пациентов с ХГВ (б)

отдельных клинических симптомов в зависимости от установленного генотипа вируса.

Данные табл. 1 показывают, что у пациентов с генотипом А чаще встречались тяжесть в эпигастрии – в 80%, тогда как у лиц с генотипом D – в 46,3% случаев ($p < 0,05$). Кожный зуд отмечался в 46,7 и 18,5% случаев соответственно ($p < 0,05$). Также значительно чаще у больных с генотипом А по сравнению с генотипом D отмечались тошнота – в 93,3% случаев ($p > 0,05$), артралгии – в 20% случаев ($p > 0,05$), повышение температуры тела – в 33% случаев ($p > 0,05$), однако указанные значения не отличались статистической достоверностью.

Анализируя некоторые биохимические показатели у пациентов с ОГВ в зависимости от выявленного генотипа было установлено (табл. 2), что для лиц с генотипом А HBV свойственно достоверное повышение активности трансаминазы АлАТ и билирубина и снижение общего белка по сравнению с соответствующими показателями у больных генотипом D.

При сравнении частоты клинических проявлений у больных ХГВ в зависимости от установленного генотипа HBV также были выявлены некоторые различия (табл. 3). Проявления диспепсического синдрома чаще встречались у лиц с генотипом А HBV по сравнению с таковыми у пациентов с генотипом D: снижение аппетита (соответственно 96,8% и 69,7% случаев), тошнота (54,8% и 18,2%), тяжесть в правом подреберье (93,5% и 54,5%).

У больных с генотипом А HBV также значительно чаще отмечались боли при пальпации в правом подреберье, при этом средние показатели отличались статистической достоверностью ($p < 0,05$). Это коррелировало с жалобами этих больных на тяжесть в правом подреберье ($p > 0,05$). У всех пациентов ХГВ с установленными генотипами А и D HBV отмечались общая слабость и гепатомегалия.

Таблица 1
Частота основных клинических симптомов у больных ОГВ в зависимости от генотипа HBV (в %)

Клинические проявления	Генотип А, n = 15	Генотип D, n = 54
Общая слабость	100	100
Снижение аппетита	100	100
Тошнота	93,3	85,2
Тяжесть в правом подреберье	100	90,7
Тяжесть в эпигастрии	80*	46,3
Кожный зуд	46,7*	18,5
Артралгии	20	16,7
Повышение температуры тела	33,3	29,6
Желтуха	100	100
Гепатомегалия	100	100

* $p < 0,05$ между данными среди различных генотипов. То же в табл. 2, 3.

Таблица 2
Уровни отдельных биохимических показателей в сыворотке крови больных ОГВ в зависимости от генотипа HBV

Показатель	Генотип А, n = 15	Генотип D, n = 54
Общий билирубин, мкмоль/л	223,3±9,2*	211,4±7,3
АлАТ, ммоль/л·ч	7,5±0,4*	5,3±0,2
Общий белок, г/л	60,9±3,2	69,5±2,9*

Изучение биохимических показателей сыворотки крови у больных ХГВ в зависимости от установленных генотипов HBV выявило, что показатели активности АлАТ были выше у лиц с генотипом А

Таблица 3

Частота основных клинических симптомов у больных ХГВ в зависимости от генотипа HBV (в %)

Клинические проявления	Генотип А, n = 15	Генотип D, n = 54
Общая слабость	100	100
Снижение аппетита	96,8*	69,7
Тошнота	54,8*	18,2
Тяжесть в правом подреберье	93,5*	54,5
Тяжесть в эпигастрии	32,3*	12,1
Кожный зуд	16,1*	3,1
Артралгии	3,2	3,1
Повышение температуры	22,6*	9,1
Желтуха	100	100
Гепатомегалия	100	100

(5,6±0,8 ммоль/л·ч) по сравнению с аналогичными при генотипе D, которые в среднем составляли 3,7±0,4 ммоль/л·ч ($p < 0,05$). У пациентов с генотипом А уровень общего билирубина превышал таковой у пациентов с генотипом D — 85,9±10,5 и 58,4±9,2 мкмоль/л соответственно ($p < 0,05$). Диспротеинемия при воспалительно-некротических процессах печеночной ткани также была несколько выше в группе больных с генотипом А. Так, концентрация гамма-глобулина у больных с данным генотипом составляла 31,4±2,6 г/л, а с генотипом D — 28,2±1,8 г/л ($p > 0,05$). Полученные результаты биохимических исследований поражения печени свидетельствуют о более высокой активности инфекционного процесса у больных ХГВ с генотипом А в отличие от пациентов с генотипом D.

Изучение особенностей клинических проявлений острой и хронической HBV-инфекции в зависимости от установленного генотипа показало, что у больных, инфицированных генотипом D HBV, наблюдалось более «мягкое» течение как острого, так и хронического ГВ с менее выраженной клинической симптоматикой, с умеренным проявлением мезенхимально-воспалительного и цитолитического синдромов и умеренными биохимическими изменениями в сыворотке крови. И, наоборот, у пациентов с генотипом А HBV отмечается более выраженное течение болезни с преобладанием диспепсических проявлений, с большей активностью некробиотических и воспалительных процессов в печени. Все это подчеркивает более высокую вирулентность и иммуногенность генотипа А HBV с более частым развитием хронизации процесса у этой группы больных.

Для изучения генотипов HDV нами было обследовано 155 больных с HBV-инфекцией: 76 больных с ОГВ и 79 — с ХГВ. РНК HDV была выявлена у 18 (11,6%) больных, из них — 7 (38,8%) мужчин и 11 (61,2%) — женщин.

Анализ полученных результатов показал, что ОГВ РНК HDV была выявлена у 7 (9,2%) больных, тогда как ХГВ РНК HDV верифицирована у 11 (13,9%), при этом был установлен генотип I вируса, субтип а. Согласно данным исследователей именно этот генотип обуславливает легкие формы инфекции с высокой частотой хронизации процесса, тогда как генотип II отличается менее патогенными свойствами. Генотип III связывают с развитием фульминантных форм HDV-инфекции.

Для определения циркулирующих генотипов HCV было обследовано 155 больных HCV-инфекцией, среди них ОГС установлен в 23,9% случаев, ХГС — в 76,1% случаев. Частота выявления отдельных генотипов HCV представлена на рис. 2. Анализ результатов молекулярно-генетических исследований установил, что РНК HCV определялась в крови всех больных ОГС и у 77,89% больных ХГС. Генотип HCV 1b оказался наиболее распространенным как среди больных ОГС (50%), так и ХГС (43,3%). Второе место занял генотип 3a, который регистрировался у 30% и 38,3% больных ОГС и ХГС соответственно. У больных ОГС с одинаковой частотой (10%) встречались комбинация генотипов 1b/3a и 2 HCV. Комбинация генотипов 1a/3a и изолированный моногенотип 1a у больных ОГС не определялся. В то же время у больных ХГС комбинация генотипов 1b/3a определялась в 6,7%. С одинаковой частотой (5,0%) регистрировались комбинация генотипов 1a/3a и моногенотип 3a. Частота регистрации генотипа 2 была наиболее редкой — всего у 1,7% больных ХГС (рис. 2).

Состояние иммунной регуляции у больных HCV-инфекцией, как известно, зависит от репликативной активности вируса, его генотипа, цитолитической активности ГС. В результате проведенных иммунологических исследований установлено, что у больных ОГС и ХГС с генотипом 3a HCV наблюдается превалирование клеточного звена иммунитета, тогда как при генотипе 1b — гуморального.

В крови больных ХГС по мере роста степени биохимической активности отмечается статистически достоверное снижение уровней клеточных иммунных показателей наряду с одновременным повышением показателей гуморального звена иммунитета.

Для выявления инфицирования HGV и TTV вирусами в Украине нами были обследованы больные острыми и хроническими формами HBV-инфекции.

При обследовании 76 больных ОГВ у 11 (14,5%) пациентов методом ПЦР была выявлена РНК HGV. В то же время у 79 больных ХГВ данный вирус был выявлен только в 5% случаев (4 больных) (рис. 3).

Проведенный анализ на наличие ДНК TTV методом ПЦР позволил выявить среди больных острой HBV-инфекцией вирус TTV у 51 (72,8%) больного (рис. 4).

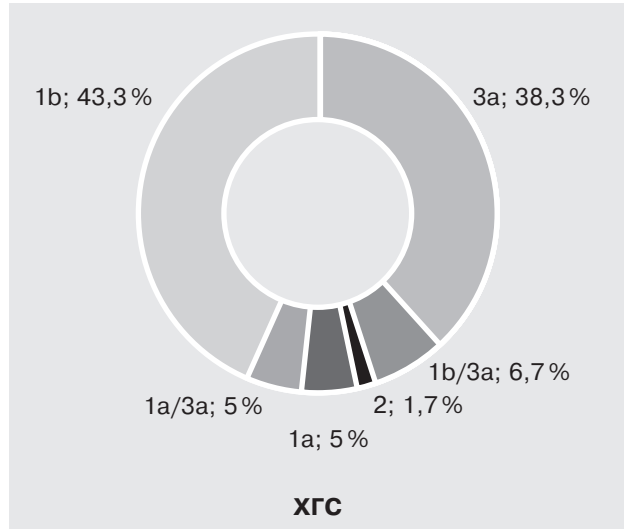
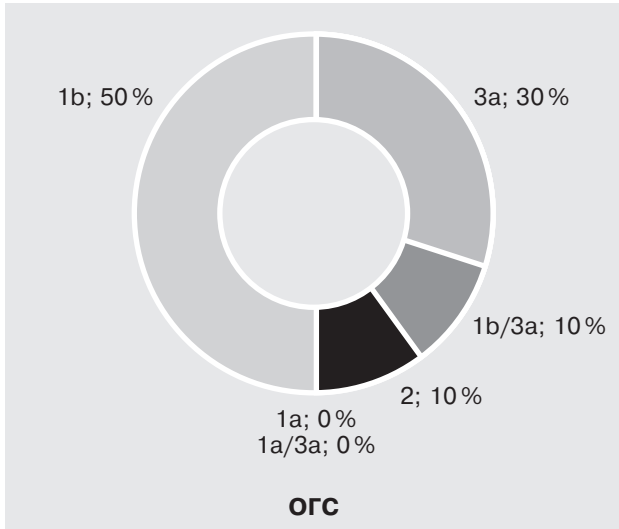


Рис. 2. Частота выявления генотипов HCV

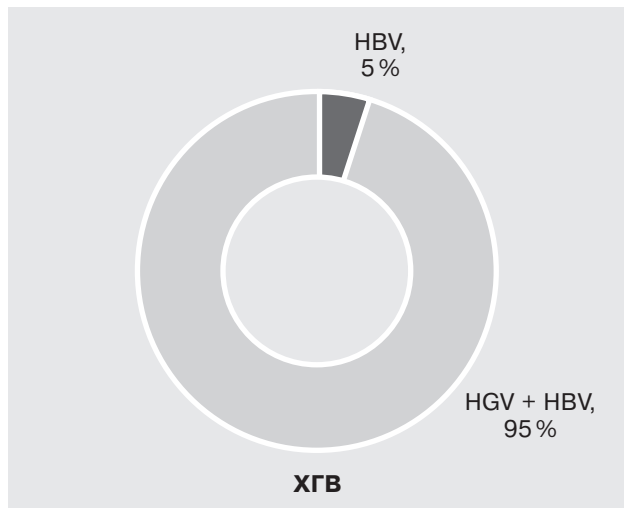
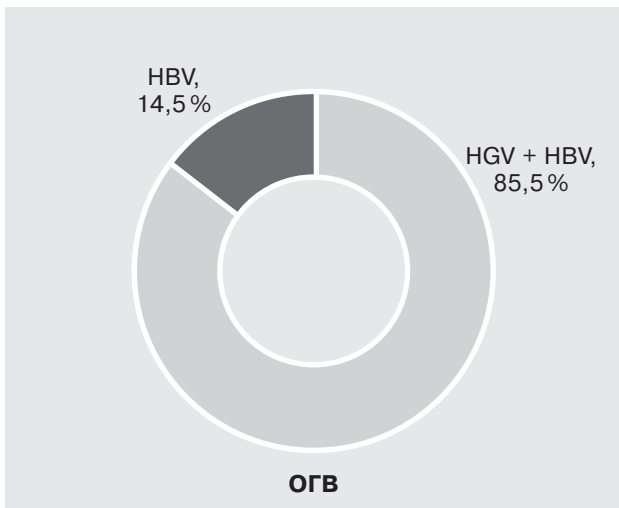


Рис. 3. Частота индикации РНК HGV у больных с разными формами HBV-инфекции

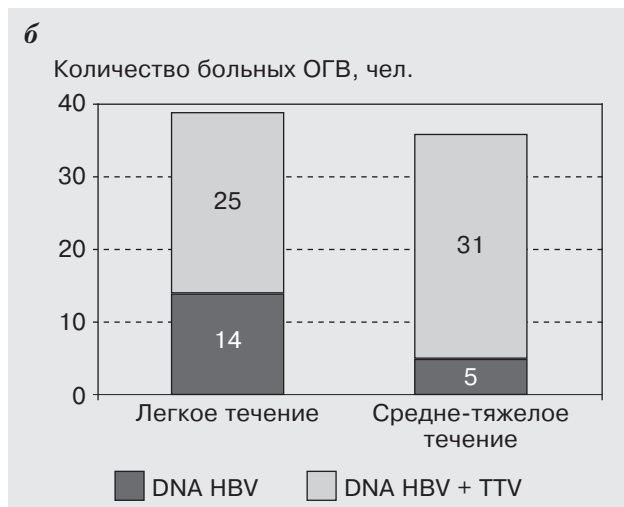
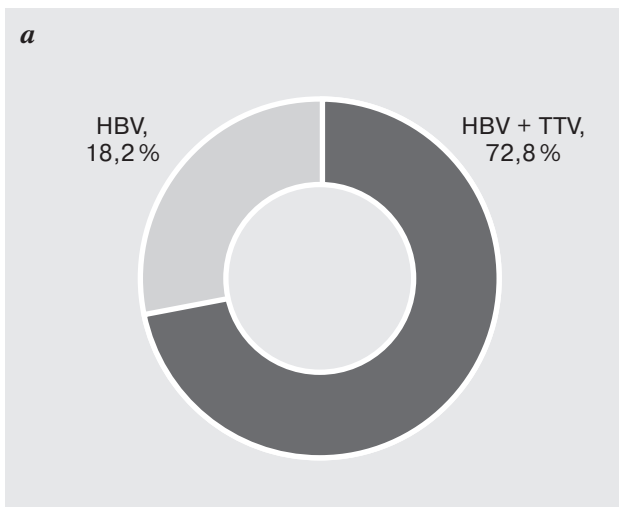


Рис. 4. Частота выявления ДНК TTV у больных ОГВ (а) и частота выявления TTV у больных с различным течением ОГВ (б)

Следует отметить, что при сравнении отдельных данных клинических проявлений болезни и биохимических изменений, а также длительности стационарного лечения достоверных отличий между ТТV-позитивными и ТТV-негативными группами больных ОГВ выявлено не было, что требует более детального изучения этого явления на большем количестве пациентов.

Таким образом, генетические особенности вирусов гепатитов могут определять течение и исходы инфекционного процесса. Генотипические особенности вирусов могут являться маркерами прогноза эффективности противовирусной терапии и стойкости вирусов к используемым препаратам. Для более полного понимания патогенеза заболевания необходимо изучение генетических особенностей возбудителя на разных уровнях гетерогенности.

Литература

1. Каретный Ю. В., Казанов Б. С., Добротворский И. Л. Вирусный гепатит А: состояние проблемы // *Вопр. совр. педиатрии.*— 2004.— Т. 3, прил. № 4.— С. 70–78.
2. Мукомолов С. Л., Калинина О. В. Молекулярная эпидемиология вирусных гепатитов // *Мир вирусных гепатитов.*— 2003.— № 11.— С. 2–7.
3. Seelig R., Renz M., Seelig H. P. PCR in diagnosis of viral hepatitis // *Ann. Med.*— 1992.— Vol. 24.— P. 225–230.
4. Rapid defection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B virus genome: correlation with viral persistence and disease severity / C. Grandjacques, P. Pradat, L. Stuyver et al. // *J. of Hepatology.*— 2000.— № 33.— P. 430–439.
5. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B / J. H. Kao, P. J. Chen, M. Y. Lai et al. // *Gastroenterology.*— 2000.— Vol. 118, № 3.— P. 554–559.
6. Guttmacher A. E., Collins F. S. Welcome to the genomic era // *N. Engl. J. Med.*— 2003.— Vol. 349 (10)— P. 996–998.
7. Xheng X., Persing D. Genetic amplification techniques for diagnosis infectious diseases // *Clin. Chem.*— 1997.— Vol. 43 (11)— P. 2021–2038.
8. Новиков Д., Мохонов В. GV вирус С / вирус гепатита G // *Мир вирусных гепатитов.*— 2001.— № 2.— С. 2–4.
9. Виницкая Е. В. ТТV-инфекция. Современное состояние проблемы // *Сучасні інфекції.*— 2005.— № 3–4.— С. 87–91.

МОЛЕКУЛЯРНА ЕПІДЕМІОЛОГІЯ ОБЛІГАТНО-ГЕПАТОТРОПНИХ ВІРУСІВ ТА ЇХ ВПЛИВ НА КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ І РЕЗУЛЬТАТИ ЗАХВОРЮВАННЯ

В. П. МАЛИЙ, Т. І. ЛЯДОВА, О. В. ВОЛОБУЄВА, О. В. ГОЛОЛОБОВА

Проведено генотипування облігатно-гепатотропних вірусів, встановлено домінуючі генотипи і геноваріанти, описано особливості клінічних проявів і результати захворювання у хворих із різними генотипами та маніфестними формами вірусних гепатитів різної етіології.

Ключові слова: імунодіагностика, генодіагностика, клінічне значення.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF OBLIGATORY HEPATOTROPIC VIRUSES AND THEIR INFLUENCE ON THE CLINICAL MANIFESTATIONS AND OUTCOME OF THE DISEASE

V. P. MALYI, T. I. LIADOVA, O. V. VOLOBUYEVA, O. V. GOLOLOBOVA

Genotyping of obligatory hepatotropic viruses was performed. Dominating genotypes and genovariants were determined. The peculiarities of clinical manifestations and outcomes of the disease in patients with various genotypes and manifest forms of viral hepatitis of various origins are described.

Key words: immunodiagnosis, genodiagnosis, clinical significance.

Поступила 06.10.2011